



⑮ **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 198 19 846 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 198 19 846.9  
㉔ Anmeldetag: 5. 5. 98  
㉕ Offenlegungstag: 11. 11. 99

⑤① Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**C 07 K 16/00**  
A 61 K 39/395  
C 12 N 15/63  
// G01N 33/569,  
33/574

**DE 198 19 846 A 1**

⑦① Anmelder:  
Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des  
öffentlichen Rechts, 69120 Heidelberg, DE  
  
⑦④ Vertreter:  
Patentanwälte Dr. Bernard Huber, Dr. Andrea  
Schüßler, 81825 München

⑦② Erfinder:  
Little, Melvyn, 69151 Neckargemünd, DE;  
Kipriyanov, Sergej, 69121 Heidelberg, DE  
  
⑤⑥ Entgegenhaltungen:  
WO 91 19 739  
CA 119:157915a;  
CA 126:130370a;

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Multivalente Antikörper-Konstrukte

⑤⑦ Die vorliegende Erfindung betrifft ein multivalentes F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukt mit mindestens vier variablen Domänen, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind. Ferner betrifft die Erfindung Expressionsplasmide, die für ein solches F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukt codieren, und ein Verfahren zur Herstellung der F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukte sowie deren Verwendung.

**DE 198 19 846 A 1**

Die vorliegende Erfindung betrifft multivalente  $F_V$ -Antikörper-Konstrukte, die kodierende Expressionsplasmide, und ein Verfahren zur Herstellung der  $F_V$ -Antikörper-Konstrukte sowie ihre Verwendung.

Natürliche Antikörper sind Dimere und werden daher als bivalent bezeichnet. Sie weisen vier variable Domänen, nämlich zwei  $V_H$ - und zwei  $V_L$ -Domänen, auf. Die variablen Domänen dienen als Bindungsstellen für ein Antigen, wobei eine Bindungsstelle aus einer  $V_H$ - und einer  $V_L$ -Domäne ausgebildet ist. Natürliche Antikörper erkennen jeweils ein Antigen, wodurch sie auch als monospezifisch bezeichnet werden. Ferner weisen sie auch konstante Domänen auf. Diese tragen zur Stabilität der natürlichen Antikörper bei. Andererseits sind sie auch für unerwünschte Immunreaktionen mitverantwortlich, die entstehen, wenn natürliche Antikörper verschiedener Tierarten wechselseitig verabreicht werden.

Zur Vermeidung solcher Immunreaktionen werden Antikörper konstruiert, denen die konstanten Domänen fehlen. Insbesondere sind dies Antikörper, die nur noch die variablen Domänen aufweisen. Solche Antikörper werden mit  $F_V$ -Antikörper-Konstrukten bezeichnet. Diese liegen häufig in Form einzelkettiger, sich miteinander gepaarter Monomere vor.

Es hat sich allerdings gezeigt, daß  $F_V$ -Antikörper-Konstrukte nur eine geringe Stabilität aufweisen. Ihre Verwendbarkeit für therapeutische Zwecke ist daher stark eingeschränkt.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, einen Antikörper bereitzustellen, mit dem unerwünschte Immunreaktionen vermieden werden können. Ferner soll er eine Stabilität aufweisen, die ihn für therapeutische Zwecke einsetzbar macht.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein multivalentes  $F_V$ -Antikörper-Konstrukt, das eine große Stabilität aufweist. Ein solches eignet sich für diagnostische und therapeutische Zwecke.

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen des Anmelders, daß die Stabilität eines  $F_V$ -Antikörper-Konstruktes erhöht werden kann, wenn dieses in Form eines einzelkettigen Dimeres vorliegt, bei dem die vier variablen Domänen über drei Peptidlinker miteinander verbunden sind. Ferner hat der Anmelder erkannt, daß sich das  $F_V$ -Antikörper-Konstrukt mit sich selbst faltet, wenn der mittlere Peptidlinker eine Länge von etwa 10–30 Aminosäuren aufweist. Des weiteren hat der Anmelder erkannt, daß sich das  $F_V$ -Antikörper-Konstrukt mit anderen  $F_V$ -Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet, wenn der mittlere Peptidlinker eine Länge von etwa bis zu 10 Aminosäuren aufweist, wodurch ein multimeres, d. h. multivalentes,  $F_V$ -Antikörper-Konstrukt erhalten wird. Auch hat der Anmelder erkannt, daß das  $F_V$ -Antikörper-Konstrukt multispezifisch sein kann.

Erfindungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders genutzt, ein multivalentes  $F_V$ -Antikörper-Konstrukt bereitzustellen, das mindestens vier variable Domänen umfaßt, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind.

Der Ausdruck " $F_V$ -Antikörper-Konstrukt" weist auf einen Antikörper hin, der variable Domänen, nicht aber konstante Domänen aufweist.

Der Ausdruck "multivalentes  $F_V$ -Antikörper-Konstrukt" weist auf einen  $F_V$ -Antikörper hin, der mehrere variable Domänen, jedoch mindestens vier aufweist. Solches wird erreicht, wenn sich das einzelkettige  $F_V$ -Antikörper-Konstrukt

mit sich selbst faltet, wodurch vier variable Domänen gegeben sind, oder sich mit anderen einzelkettigen  $F_V$ -Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet. In letzterem Fall liegt ein  $F_V$ -Antikörper-Konstrukt vor, das 8, 12, 16, etc. variable Domänen aufweist. Günstig ist es, wenn das  $F_V$ -Antikörper-Konstrukt vier oder acht variable Domänen aufweist, d. h. es ist bi- oder tetravalent (vgl. Fig. 1). Ferner können die variablen Domänen gleich oder verschieden voneinander sein, wodurch das Antikörper-Konstrukt ein oder mehrere Antigene erkennt. Vorzugsweise erkennt das Antikörper-Konstrukt ein oder zwei Antigene, d. h. es ist mono- bzw. bispezifisch. Beispiele solcher Antigene sind die Proteine CD19 und CD3.

Der Ausdruck "Peptidlinker 1, 3" weist auf einen Peptidlinker hin, der geeignet ist, variable Domänen eines  $F_V$ -Antikörper-Konstruktes miteinander zu verbinden. Der Peptidlinker kann jegliche Aminosäuren enthalten, wobei die Aminosäuren Glycin (G), Serin (S) und Prolin (P) bevorzugt sind. Die Peptidlinker 1 und 3 können gleich oder verschieden voneinander sein. Ferner kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 0–10 Aminosäuren aufweisen. In ersterem Fall ist der Peptidlinker lediglich eine Peptidbindung aus dem COOH-Rest einer der variablen Domänen und dem  $NH_2$ -Rest einer anderen der variablen Domänen. Vorzugsweise weist der Peptidlinker die Aminosäuresequenz GG auf.

Der Ausdruck "Peptidlinker 2" weist auf einen Peptidlinker hin, der geeignet ist, variable Domänen eines  $F_V$ -Antikörper-Konstruktes miteinander zu verbinden. Der Peptidlinker kann jegliche Aminosäuren enthalten, wobei die Aminosäuren Glycin (G), Serin (S) und Prolin (P) bevorzugt sind. Ferner kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 3–10 Aminosäuren, insbesondere 5 Aminosäuren, und ganz besonders die Aminosäuresequenz GGPGS, aufweisen, wodurch erreicht wird, daß sich das einzelkettige  $F_V$ -Antikörper-Konstrukt mit anderen einzelkettigen  $F_V$ -Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet. Des weiteren kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 11–20 Aminosäuren, insbesondere 15–20 Aminosäuren, und ganz besonders die Aminosäuresequenz  $(G_4S)_4$ , aufweisen, wodurch erreicht wird, daß sich das einzelkettige  $F_V$ -Antikörper-Konstrukt mit sich selbst faltet.

Ein erfindungsgemäßes  $F_V$ -Antikörper-Konstrukt kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Günstig ist ein Verfahren, bei dem für die Peptidlinker 1, 2 und 3 kodierende DNAs mit für die vier variablen Domänen eines  $F_V$ -Antikörper-Konstruktes kodierenden DNAs ligiert werden derart, daß die Peptidlinker die variablen Domänen miteinander verbinden, und das erhaltene DNA-Molekül in einem Expressionsplasmid exprimiert wird. Es wird auf die Beispiele 1–5 verwiesen. Hinsichtlich der Ausdrücke " $F_V$ -Antikörper-Konstrukt" und "Peptidlinker" wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen. Ergänzend wird auf Maniatis, T. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory 1982, verwiesen.

DNAs, die für ein erfindungsgemäßes  $F_V$ -Antikörper-Konstrukt kodieren, sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ferner sind Expressionsplasmide, die solche DNAs enthalten, auch Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Bevorzugte Expressionsplasmide sind pDISC3  $\times$  19-LL, pDISC3  $\times$  19-SL, pPiC-DISC-LL und pPiC-DISC-SL. Diese wurden bei der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellen) am 30. April 1998 unter DSM 12150, DSM 12149, DSM 12152 bzw. DSM 12151 hinterlegt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit, umfassend:

- (a) ein erfindungsgemäßes F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt, und/oder
- (b) ein erfindungsgemäßes Expressionsplasmid, sowie
- (c) übliche Hilfsstoffe, wie Puffer, Lösungsmittel und Kontrollen.

Von den einzelnen Komponenten können ein oder mehrere Vertreter vorliegen.

Die vorliegende Erfindung stellt ein multivalentes F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt bereit, bei dem die variablen Domänen über Peptidlinker miteinander verbunden sind. Ein solches Antikörper-Konstrukt zeichnet sich dadurch aus, daß es keine Teile enthält, die zu unerwünschten Immunreaktionen führen können. Ferner weist es eine große Stabilität auf. Des weiteren ermöglicht es mehrere Antigene gleichzeitig zu binden. Das erfindungsgemäße F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt eignet sich daher bestens nicht nur für diagnostische, sondern auch für therapeutische Zwecke verwendet zu werden. Solche Zwecke können hinsichtlich jeder Erkrankung, insbesondere einer viralen, bakteriellen oder Tumor-Erkrankung, gesehen werden.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

**Fig. 1** zeigt die genetische Organisation eines erfindungsgemäßen F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes (A) und Schemata zur Bildung eines bivalenten (B) bzw. tetravalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes (C). Ag: Antigen; His<sub>6</sub>: sechs C-terminale Histidinreste; Stop: Stoppcodon (TAA); V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub>: variable Region der schweren und der leichten Kette.

**Fig. 2** zeigt das Schema zur Konstruktion der Plasmide pDISC3 × 19-LL und pDISC3 × 19-SL. c-myc: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E1 erkannt wird; His<sub>6</sub>: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; PelB: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase (PelB-Leader); rbs: Ribosomenbindungsstelle; Stop: Stoppcodon (TAA); V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub>: variable Region der schweren und der leichten Kette.

**Fig. 3** zeigt ein Diagramm des Expressionsplasmids pDISC3 × 19-LL. 6 × His: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; bla: Gen, das für β-Lactamase kodiert, die für Ampicillinresistenz verantwortlich ist; bp: Basenpaare; c-myc: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; ColE1: Origin der DNA-Replikation; f1-IG: intergenische Region des Bakteriophagen f1; Lac P/O: wt lac-Operon-Promotor/Operator; Linker 1: Sequenz, die für ein GlyGly-Dipeptid kodiert, das die V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>-Domänen verknüpft; Linker 2: Sequenz, die für ein (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>-Polypeptid kodiert, das die hybriden scFv-Fragmente verknüpft; Pel-B-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase; rbs: Ribosomenbindungsstelle; V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub>: variable Region der schweren und der leichten Kette.

**Fig. 4** zeigt ein Diagramm des Expressionsplasmids pDISC3 × 19-SL. 6 × His: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste codiert; bla: Gen, das für βpaare; c-myc: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; ColE1: Origin der DNA-Replikation; f1-IG: intergenische Region des Bakteriophagen f1; Lac P/O: wt lac-Operon-Promotor/Operator; Linker 1: Sequenz, die für ein GlyGly-Dipeptid codiert, das die V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>-Domänen verknüpft; Linker 3: Sequenz, die für ein GlyGlyProGlySer-Oligopeptid codiert, das die hybriden scFv-Fragmente verknüpft; Pel-B-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase; rbs: Ribosomenbindungsstelle; V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub>: variable Region der schweren und der leichten Kette.

**Fig. 5** zeigt die Nukleotid- und die davon abgeleitete

Aminosäuresequenz des durch das Expressionsplasmid pDISC3 × 19-LL kodierten bivalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes. c-myc-Epitop: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; CDR: Komplementarität bestimmende Region; Gerüst: Gerüstregion (Framework-Region); His<sub>6</sub>-Schwanz, Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; PelB-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase; RBS: Ribosomenbindungsstelle; V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub>: variable Region der schweren und der leichten Kette.

**Fig. 6** zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz des durch das Expressionsplasmid pDISC3 × 19-SL kodierten tetravalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes. c-myc-Epitop: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; CDR: Komplementarität bestimmende Region; Gerüst: Gerüstregion (Framework-Region); His<sub>6</sub>-Schwanz, Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; PelB-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase; RBS: Ribosomenbindungsstelle; V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub>: variable Region der schweren und der leichten Kette.

**Fig. 7** zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz einer Verbindung zwischen einem Gen, das für eine α-Faktor-Leadersequenz kodiert, und einem Gen, das für das tetravalente F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt codiert, in dem Pichia-Expressionsplasmid pPIC-DISC-SL. Alpha-Faktor-Signal: Leaderpeptidsequenz des Saccharomyces cerevisiae-α-Faktor-Sekretionssignals; V<sub>H</sub>: variable Region der schweren Kette. Rauten zeigen die Signalspaltstellen an.

**Fig. 8** zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz einer Verbindung zwischen einem Gen, das für eine α-Faktor-Leadersequenz kodiert, und einem Gen, das für das bivalente F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt codiert, in dem Pichia-Expressionsplasmid pPIC-DISC-LL. Alpha-Faktor-Signal: Leaderpeptidsequenz des Saccharomyces cerevisiae-α-Faktor-Sekretionssignals; V<sub>H</sub>: variable Region der schweren Kette. Rauten zeigen die Signalspaltstellen an.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert.

#### Beispiel 1

Konstruktion der Plasmide pDISC3 × 19-LL und pDISC3 × 19-SL zur Expression von bivalenten, bispezifischen bzw. tetravalenten, bispezifischen F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukten in Bakterien

Die Plasmide pHOG-αCD19 und pHOG-dmOKT3, welche für die scFv-Fragmente codieren, die von dem Hybridom HD37, das für menschliches CD19 (Kipriyanov et al., 1996, J. Immunol. Meth. 196, 51–62) spezifisch ist, bzw. von dem Hybridom OKT3, das für menschliches CD3 (Kipriyanov et al., 1997, Protein Eng. 10, 445–453) spezifisch ist, abgeleitet sind, wurde zur Konstruktion von Expressionsplasmiden für ein einzelkettiges F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt verwendet. Ein PCR-Fragment 1 der V<sub>H</sub>-Domäne von Anti-CD19, gefolgt von einem Segment, das für einen GlyGly-Linker codiert, wurde unter Verwendung der Primer DP1, 5'-TCACACAGAATTCTTAGATCTATTAAAGAGAGAAATTAACC, und DP2, 5'-AGCACACGATATCACCGCCAAGCTTGGGTGTTGTTTGGC, erzeugt (vgl. **Fig. 2**). Das PCR-Fragment 1 wurde mit EcoRI und EcoRV gespalten und mit dem mit EcoRI/EcoRV linearisierten Plasmid pHOG-dmOKT3 ligiert, wodurch der Vektor pHOG19-3 erzeugt wurde. Das PCR-Fragment 2 der V<sub>L</sub>-Domäne von Anti-CD19, gefolgt von einem Segment, das für ein c-myc-Epitop und einen Hexahistidynschwanz codiert, wurde unter Verwendung der Primer DP3, 5'-AGCA-

CACAAGCTTGGCGGTGATATCTTGCTCACCCAAAC-  
TCCA, und DP4, 5'-AGCACACTCTAGAGACACACA-  
GATCTTTAGTGATGGTGATGTGAGTTTAG-  
G, erzeugt. Das PCR-Fragment 2 wurde mit HindIII und  
XbaI gespalten und mit dem durch HindIII/XbaI linearisier-  
ten Plasmid pHOG-dmOKT3 ligiert, wodurch der Vektor  
pHOG3-19 erhalten wurde (vgl. Fig. 2). Das für das hybride  
scFv-3-19 codierende Gen in dem Plasmid pHOG3-19  
wurde mittels PCR mit den Primern Bi3sk, 5'-  
CAGCCGGCCATGGCGCAGGTGCAACTGCAGCAG  
und entweder Li-1, 5'-TATA-  
TACTGCAGCTGCACCTGGCTACCACCAC-  
CACCGGAGCCGCCACCACCGCTACCACCGCCGCC-  
AGAACCACCACCAGCGGCCGCAGCATCAGCC-  
CG, zur Erzeugung eines langen flexiblen (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>-inter-  
scFv-Linkers (PCR-Fragment 3, vgl. Fig. 2) oder Li-2, 5'-  
TATATACTGCAGCTGCACCTGCGACCTGGGCCAC-  
CAGCGGCCGCAGCATCAGCCCG, zur Erzeugung eines  
kurzen, starren GGPGS-Linkers (PCR-Fragment 4, vgl. Fig.  
2) amplifiziert. Die Expressionsplasmide pDISC3 × 19-LL  
und pDISC3 × 19-SL wurden durch Ligierung des NcoI/  
PvuII-Restriktionsfragments aus pHOG 19-3, umfassend  
das Vektorgerüst und die NcoI/PvuII-gespaltenen PCR-  
Fragmente 3 bzw. 4 konstruiert (vgl. Fig. 3, 4). Die vollstän-  
dige Nukleotid- und Proteinsequenzen der bivalenten bzw.  
tetravalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte sind in den Fig. 5  
bzw. 6 angegeben.

#### Beispiel 2

Konstruktion der Plasmide pPIC-DISC-LL und pPIC-  
DISC-SL zur Expression von bivalenten, bispezifischen  
bzw. tetravalenten, bispezifischen F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruk-  
ten in Hefe

##### (A) Konstruktion von pPIC-DISC-SL

Der Vektor pPICZαA (Invitrogen BV, Leek, Niederlande)  
zur Expression und Sekretion von rekombinanten Proteinen  
in der Hefe *Pichia pastoris* wurde als Ausgangsmaterial ver-  
wendet. Er enthält ein Gen, das für das *Saccharomyces cere-*  
*visiae* α-Faktor-Sekretionssignal codiert, gefolgt von einem  
Polylinker. Die Sekretion dieses Vektors beruht auf dem do-  
minanten selektierbaren Marker, Zeocin<sup>TM</sup>, der sowohl in  
*Pichia* als auch in *E. coli* bifunktionell ist. Das Gen, das für  
das tetravalente F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt (scDia-SL) co-  
diert, wurde mittels PCR von der Matrize pDISC3 × 19-SL  
unter Verwendung der Primer 5-PIC, 5'-  
CCGTGAATTCCAGGTGCAACTGCAG-  
CAGTCTGGGGCTGAACTGGC, und pSEXbN 5'-  
GGTTCGACGTTAACCGACAAACAACAGATAAAACG  
amplifiziert. Das so erhaltene PCR-Produkt wurde mit  
EcoRI und XbaI gespalten und in mit EcoRI/XbaI lineari-  
siertes pPICZαA ligiert. Es wurde das Expressionsplasmid  
pPIC-DISC-SL erhalten. Die Nukleotid- und Proteinsequen-  
zen des tetravalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes sind in  
Fig. 7 gezeigt.

##### (B) Konstruktion von pPIC-DISC-LL

Die Konstruktion von pPIC-DISC-LL wurde auf der  
Grundlage von pPICZαA (Invitrogen BV, Leek, Nieder-  
lande) und pDISC3 × 19-LL (vgl. Fig. 3) durchgeführt. Die  
Plasmid-DNA pPICZαA wurde mit EcoRI gespalten. Die  
überstehenden 5'-Enden wurden unter Verwendung eines  
Klenow-Fragments der *E. coli*-DNA-Polymerase I aufge-  
füllt. Die so erhaltene DNA wurde mit XbaI gespalten, und  
das große Fragment, umfassend den pPIC-Vektor, wurde

isoliert. Analog wurde die DNA von pDISC3 × 19-LL mit  
NcoI gespalten und mit einem Klenow-Fragment behandelt.  
Nach der Spaltung mit XbaI wurde ein kleines Fragment,  
umfassend ein für den bivalenten F<sub>v</sub>-Antikörper kodieren-  
des Gen, isoliert. Dessen Ligierung mit einer pPIC-abgelei-  
teten Vektor-DNA ergab das Plasmid pPIC-DISC-LL. Die  
Nukleotid- und Proteinsequenz des bivalenten F<sub>v</sub>-Antikör-  
per-Konstruktes sind in Fig. 8 gezeigt.

#### Beispiel 3

Expression des tetravalenten bzw. bivalenten F<sup>II</sup>-Antikör-  
per-Konstruktes in Bakterien

*E. coli*-XL1-Blue-Zellen (Stratagene, La Jolla, CA), die  
mit den Expressionsplasmiden pDISC3 × 19-LL bzw.  
pDISC3 × 19-SL transformiert worden waren, wurden über  
Nacht in 2×YT-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin und  
100 mM Glucose (2×YT<sub>GA</sub>) bei 37°C gezüchtet. 1 : 50-Ver-  
dünnungen der Übernachtskulturen in 2×YT<sub>GA</sub> wurden als  
Kolbenkulturen bei 37°C unter Schütteln mit 200 UpM ge-  
züchtet. Als die Kulturen einen OD<sub>600</sub>-Wert von 0,8 erreicht  
hatten, wurden die Bakterien durch 10minütige Zentrifuga-  
tion mit 1500 g bei 20°C pelletiert und in dem gleichen Vo-  
lumen eines frischen 2×YT-Mediums, das 50 µg/ml Ampi-  
cillin und 0,4 M Saccharose enthielt, resuspendiert. IPTG  
wurde bis zu einer Endkonzentration von 0,1 mM zugesetzt,  
und das Wachstum wurde bei Raumtemperatur (20–22°C)  
18–20 h fortgesetzt. Die Zellen wurden durch 10minütige  
Zentrifugation mit 5000 g bei 4°C geerntet. Der Kulturüber-  
stand wurde zurückgehalten und auf Eis gelagert. Um die  
löslichen periplasmatischen Proteine zu isolieren, wurden  
die pelletierten Bakterien in 5% des Anfangsvolumens an  
eiskalter 50 mM Tris-HCl, 20% Saccharose, 1 mM EDTA,  
pH 8,0, resuspendiert. Nach einer 1 stündigen Inkubation  
auf Eis unter gelegentlichem Rühren wurden die Sphäropla-  
sten mit 30.000 g 30 min bei 4°C zentrifugiert, wobei der  
lösliche periplasmatische Extrakt als Überstand und die  
Sphäroplasten mit dem unlöslichen periplasmatischen Ma-  
terial als Pellet erhalten wurden. Der Kulturüberstand und  
der lösliche periplasmatische Extrakt wurden vereinigt,  
durch weitere Zentrifugation (30.000 g, 4°C, 40 min) ge-  
klärt. Das rekombinante Produkt wurde durch Ammonium-  
sulfatfällung (Endkonzentration 70% Sättigung) eingengt.  
Das Proteinpräzipitat wurde durch Zentrifugation (10.000 g,  
4°C, 40 min) gewonnen und in 10% des Anfangsvolumens  
an 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0, aufgelöst. Eine im-  
mobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC)  
wurde bei 4°C unter Verwendung einer 5 ml Säule an chela-  
tierender Sepharose (Pharmacia), die mit Cu<sup>2+</sup> beladen war  
und mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0 (Startpuffer)  
equilibriert worden war, durchgeführt. Die Probe wurde  
durch ihr Leiten über die Säule aufgeladen. Sie wurde dann  
mit zwanzig Säulenvolumina Startpuffer, gefolgt von Start-  
puffer mit 50 mM Imidazol, bis die Absorption bei 280 nm  
des Effluenten minimal war, gewaschen (etwa dreißig Säu-  
lenvolumina). Das absorbierte Material wurde mit 50 mM  
Tris-HCl, 1 M NaCl, 250 mM Imidazol, pH 7,0, eluiert.

Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem Bradford-  
Farbstoffbindungstest (1976, Anal. Biochem., 72, 248–254)  
unter Verwendung des Bio-Rad(München, Deutschland)-  
Proteinassaykits bestimmt. Die Konzentrationen der gerei-  
nigten tetravalenten bzw. bivalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Kon-  
strukte wurden aus den A<sub>280</sub>-Werten unter Verwendung der  
Extinktionskoeffizienten ε<sup>1mg/ml</sup> = 1,96 bzw. 1,93 bestimmt.

## Beispiel 4

Expression des tetravalenten bzw. bivalenten Antikörper-Konstruktes in der Hefe *Pichia pastoris*

Kompetente *P. pastoris* GS155-Zellen (Invitrogen) wurden in Gegenwart von 10 pg Plasmid-DNA von pPIC-DISC-LL bzw. pPIC-DISC-SL, die mit SacI linearisiert worden war, elektroporiert. Die Transformanten wurden 3 Tage bei 30°C auf YPD-Platten, die 100 pg/ml Zeocin™

enthielten, selektiert. Die Klone, die bivalente bzw. tetravalente F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte sezernierten, wurden durch Plattenscreening unter Verwendung eines anti-c-myc-mAk 9E10 (IC Chemikalien, Ismaning, Deutschland) selektiert. Zur Expression der bivalenten bzw. tetravalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte wurden die Klone in YPD-Medium in Schüttelkolben 2 Tage bei 30°C unter Rühren gezüchtet. Die Zellen wurden zentrifugiert, in dem gleichen Volumen des Mediums, das Methanol enthielt, resuspendiert und weitere 3 Tage bei 30°C unter Rühren inkubiert. Die Überstände wurden nach der Zentrifugation gewonnen. Das rekombinante Produkt wurde durch Ammoniumsulfatfällung, gefolgt von IMAC, wie vorstehend beschrieben, isoliert.

## Beispiel 5

Charakterisierung des tetravalenten bzw. bivalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes

## (A) Größenausschlußchromatographie

Eine analytische Gelfiltration der F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte wurde in PBS unter Verwendung einer Superdex-200-HR10/30-Säule (Pharmacia) durchgeführt. Das Probenvolumen und die Fließgeschwindigkeit betrugen 200 µl/min bzw. 0,5 ml/min. Die Säule wurde mit hoch- und niedermolekularen Gelfiltrations-Kalibrationskits (Pharmacia) kalibriert.

## (B) Durchflußzytometrie

Die menschliche CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>-</sup>-akute-T-Zell-Leukämie Jurkat und die CD19<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>-B-Zelllinie JOK-1 wurden für die Durchflußzytometrie verwendet.  $5 \times 10^5$  Zellen in 50 µl RPMI 1640-Medium (GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland), das mit 10% FCS und 0,1% Natriumazid supplementiert war (als vollständiges Medium bezeichnet), wurden mit 100 µl der F<sub>v</sub>-Antikörper-Präparate 45 min auf Eis inkubiert. Nach Waschen mit dem vollständigen Medium wurden die Zellen mit 100 µl 10 µg/ml anti-c-myc-Mak 9E10 (IC Chemikalien) in dem gleichen Puffer 45 min auf Eis inkubiert. Nach einem zweiten Waschzyklus wurden die Zellen mit 100 µl des FITC-markierten Ziege-anti-Maus-IgG (GIBCO BRL) unter den gleichen Bedingungen wie vorher inkubiert. Die Zellen wurden dann erneut gewaschen und in 100 µl 1 µg/ml-Propidiumiodid-Lösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in vollständigem Medium unter Ausschluß von toten Zellen resuspendiert. Die relative Fluoreszenz der gefärbten Zellen wurde unter Verwendung eines FACScan-Durchflußzytometers (Becton Dickinson, Mountain View, CA) gemessen.

## (C) Cytotoxizitätstest

Die CD19-exprimierende Burkitt-Lymphoma-Zelllinie Raji und Namalwa wurden als Zielzellen verwendet. Die Zellen wurden in RPMI 1640 (GIBCO BRL), das mit 10% hitzeinaktiviertem FCS (GIBCO BRL), 2 mM Glutamin und

1 mM Pyruvat supplementiert war, bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre mit 7,5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die cytotoxischen T-Zell-Tests wurden in RPMI-1640-Medium, das mit 10% FCS, 10 mM HEPES, 2 mM Glutamin, 1 mM Pyruvat und 0,05 mM 2-ME supplementiert war, durchgeführt. Die cytotoxische Aktivität wurde unter Verwendung eines Standard [<sup>51</sup>Cr]-Freisetzungstests bewertet;  $2 \times 10^6$  Zielzellen wurden mit 200 µl Na [<sup>51</sup>Cr]O<sub>4</sub> (Amersham-Buchler, Braunschweig, Deutschland) markiert und 4mal gewaschen und anschließend in Medium in einer Konzentration von  $2 \times 10^5$ /ml resuspendiert. Die Effektorzellen wurden auf eine Konzentration von  $5 \times 10^6$ /ml eingestellt. Zunehmende Mengen an CTLs in 100 µl wurden auf 104 Zielzellen/Vertiefung in 50 µl titriert. 50 µl Antikörper wurden jeder Vertiefung zugesetzt. Der gesamte Test wurde dreifach ange-  
 5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65  
 70  
 75  
 80  
 85  
 90  
 95  
 100  
 105  
 110  
 115  
 120  
 125  
 130  
 135  
 140  
 145  
 150  
 155  
 160  
 165  
 170  
 175  
 180  
 185  
 190  
 195  
 200  
 205  
 210  
 215  
 220  
 225  
 230  
 235  
 240  
 245  
 250  
 255  
 260  
 265  
 270  
 275  
 280  
 285  
 290  
 295  
 300  
 305  
 310  
 315  
 320  
 325  
 330  
 335  
 340  
 345  
 350  
 355  
 360  
 365  
 370  
 375  
 380  
 385  
 390  
 395  
 400  
 405  
 410  
 415  
 420  
 425  
 430  
 435  
 440  
 445  
 450  
 455  
 460  
 465  
 470  
 475  
 480  
 485  
 490  
 495  
 500  
 505  
 510  
 515  
 520  
 525  
 530  
 535  
 540  
 545  
 550  
 555  
 560  
 565  
 570  
 575  
 580  
 585  
 590  
 595  
 600  
 605  
 610  
 615  
 620  
 625  
 630  
 635  
 640  
 645  
 650  
 655  
 660  
 665  
 670  
 675  
 680  
 685  
 690  
 695  
 700  
 705  
 710  
 715  
 720  
 725  
 730  
 735  
 740  
 745  
 750  
 755  
 760  
 765  
 770  
 775  
 780  
 785  
 790  
 795  
 800  
 805  
 810  
 815  
 820  
 825  
 830  
 835  
 840  
 845  
 850  
 855  
 860  
 865  
 870  
 875  
 880  
 885  
 890  
 895  
 900  
 905  
 910  
 915  
 920  
 925  
 930  
 935  
 940  
 945  
 950  
 955  
 960  
 965  
 970  
 975  
 980  
 985  
 990  
 995  
 1000  
 1005  
 1010  
 1015  
 1020  
 1025  
 1030  
 1035  
 1040  
 1045  
 1050  
 1055  
 1060  
 1065  
 1070  
 1075  
 1080  
 1085  
 1090  
 1095  
 1100  
 1105  
 1110  
 1115  
 1120  
 1125  
 1130  
 1135  
 1140  
 1145  
 1150  
 1155  
 1160  
 1165  
 1170  
 1175  
 1180  
 1185  
 1190  
 1195  
 1200  
 1205  
 1210  
 1215  
 1220  
 1225  
 1230  
 1235  
 1240  
 1245  
 1250  
 1255  
 1260  
 1265  
 1270  
 1275  
 1280  
 1285  
 1290  
 1295  
 1300  
 1305  
 1310  
 1315  
 1320  
 1325  
 1330  
 1335  
 1340  
 1345  
 1350  
 1355  
 1360  
 1365  
 1370  
 1375  
 1380  
 1385  
 1390  
 1395  
 1400  
 1405  
 1410  
 1415  
 1420  
 1425  
 1430  
 1435  
 1440  
 1445  
 1450  
 1455  
 1460  
 1465  
 1470  
 1475  
 1480  
 1485  
 1490  
 1495  
 1500  
 1505  
 1510  
 1515  
 1520  
 1525  
 1530  
 1535  
 1540  
 1545  
 1550  
 1555  
 1560  
 1565  
 1570  
 1575  
 1580  
 1585  
 1590  
 1595  
 1600  
 1605  
 1610  
 1615  
 1620  
 1625  
 1630  
 1635  
 1640  
 1645  
 1650  
 1655  
 1660  
 1665  
 1670  
 1675  
 1680  
 1685  
 1690  
 1695  
 1700  
 1705  
 1710  
 1715  
 1720  
 1725  
 1730  
 1735  
 1740  
 1745  
 1750  
 1755  
 1760  
 1765  
 1770  
 1775  
 1780  
 1785  
 1790  
 1795  
 1800  
 1805  
 1810  
 1815  
 1820  
 1825  
 1830  
 1835  
 1840  
 1845  
 1850  
 1855  
 1860  
 1865  
 1870  
 1875  
 1880  
 1885  
 1890  
 1895  
 1900  
 1905  
 1910  
 1915  
 1920  
 1925  
 1930  
 1935  
 1940  
 1945  
 1950  
 1955  
 1960  
 1965  
 1970  
 1975  
 1980  
 1985  
 1990  
 1995  
 2000  
 2005  
 2010  
 2015  
 2020  
 2025  
 2030  
 2035  
 2040  
 2045  
 2050  
 2055  
 2060  
 2065  
 2070  
 2075  
 2080  
 2085  
 2090  
 2095  
 2100  
 2105  
 2110  
 2115  
 2120  
 2125  
 2130  
 2135  
 2140  
 2145  
 2150  
 2155  
 2160  
 2165  
 2170  
 2175  
 2180  
 2185  
 2190  
 2195  
 2200  
 2205  
 2210  
 2215  
 2220  
 2225  
 2230  
 2235  
 2240  
 2245  
 2250  
 2255  
 2260  
 2265  
 2270  
 2275  
 2280  
 2285  
 2290  
 2295  
 2300  
 2305  
 2310  
 2315  
 2320  
 2325  
 2330  
 2335  
 2340  
 2345  
 2350  
 2355  
 2360  
 2365  
 2370  
 2375  
 2380  
 2385  
 2390  
 2395  
 2400  
 2405  
 2410  
 2415  
 2420  
 2425  
 2430  
 2435  
 2440  
 2445  
 2450  
 2455  
 2460  
 2465  
 2470  
 2475  
 2480  
 2485  
 2490  
 2495  
 2500  
 2505  
 2510  
 2515  
 2520  
 2525  
 2530  
 2535  
 2540  
 2545  
 2550  
 2555  
 2560  
 2565  
 2570  
 2575  
 2580  
 2585  
 2590  
 2595  
 2600  
 2605  
 2610  
 2615  
 2620  
 2625  
 2630  
 2635  
 2640  
 2645  
 2650  
 2655  
 2660  
 2665  
 2670  
 2675  
 2680  
 2685  
 2690  
 2695  
 2700  
 2705  
 2710  
 2715  
 2720  
 2725  
 2730  
 2735  
 2740  
 2745  
 2750  
 2755  
 2760  
 2765  
 2770  
 2775  
 2780  
 2785  
 2790  
 2795  
 2800  
 2805  
 2810  
 2815  
 2820  
 2825  
 2830  
 2835  
 2840  
 2845  
 2850  
 2855  
 2860  
 2865  
 2870  
 2875  
 2880  
 2885  
 2890  
 2895  
 2900  
 2905  
 2910  
 2915  
 2920  
 2925  
 2930  
 2935  
 2940  
 2945  
 2950  
 2955  
 2960  
 2965  
 2970  
 2975  
 2980  
 2985  
 2990  
 2995  
 3000  
 3005  
 3010  
 3015  
 3020  
 3025  
 3030  
 3035  
 3040  
 3045  
 3050  
 3055  
 3060  
 3065  
 3070  
 3075  
 3080  
 3085  
 3090  
 3095  
 3100  
 3105  
 3110  
 3115  
 3120  
 3125  
 3130  
 3135  
 3140  
 3145  
 3150  
 3155  
 3160  
 3165  
 3170  
 3175  
 3180  
 3185  
 3190  
 3195  
 3200  
 3205  
 3210  
 3215  
 3220  
 3225  
 3230  
 3235  
 3240  
 3245  
 3250  
 3255  
 3260  
 3265  
 3270  
 3275  
 3280  
 3285  
 3290  
 3295  
 3300  
 3305  
 3310  
 3315  
 3320  
 3325  
 3330  
 3335  
 3340  
 3345  
 3350  
 3355  
 3360  
 3365  
 3370  
 3375  
 3380  
 3385  
 3390  
 3395  
 3400  
 3405  
 3410  
 3415  
 3420  
 3425  
 3430  
 3435  
 3440  
 3445  
 3450  
 3455  
 3460  
 3465  
 3470  
 3475  
 3480  
 3485  
 3490  
 3495  
 3500  
 3505  
 3510  
 3515  
 3520  
 3525  
 3530  
 3535  
 3540  
 3545  
 3550  
 3555  
 3560  
 3565  
 3570  
 3575  
 3580  
 3585  
 3590  
 3595  
 3600  
 3605  
 3610  
 3615  
 3620  
 3625  
 3630  
 3635  
 3640  
 3645  
 3650  
 3655  
 3660  
 3665  
 3670  
 3675  
 3680  
 3685  
 3690  
 3695  
 3700  
 3705  
 3710  
 3715  
 3720  
 3725  
 3730  
 3735  
 3740  
 3745  
 3750  
 3755  
 3760  
 3765  
 3770  
 3775  
 3780  
 3785  
 3790  
 3795  
 3800  
 3805  
 3810  
 3815  
 3820  
 3825  
 3830  
 3835  
 3840  
 3845  
 3850  
 3855  
 3860  
 3865  
 3870  
 3875  
 3880  
 3885  
 3890  
 3895  
 3900  
 3905  
 3910  
 3915  
 3920  
 3925  
 3930  
 3935  
 3940  
 3945  
 3950  
 3955  
 3960  
 3965  
 3970  
 3975  
 3980  
 3985  
 3990  
 3995  
 4000  
 4005  
 4010  
 4015  
 4020  
 4025  
 4030  
 4035  
 4040  
 4045  
 4050  
 4055  
 4060  
 4065  
 4070  
 4075  
 4080  
 4085  
 4090  
 4095  
 4100  
 4105  
 4110  
 4115  
 4120  
 4125  
 4130  
 4135  
 4140  
 4145  
 4150  
 4155  
 4160  
 4165  
 4170  
 4175  
 4180  
 4185  
 4190  
 4195  
 4200  
 4205  
 4210  
 4215  
 4220  
 4225  
 4230  
 4235  
 4240  
 4245  
 4250  
 4255  
 4260  
 4265  
 4270  
 4275  
 4280  
 4285  
 4290  
 4295  
 4300  
 4305  
 4310  
 4315  
 4320  
 4325  
 4330  
 4335  
 4340  
 4345  
 4350  
 4355  
 4360  
 4365  
 4370  
 4375  
 4380  
 4385  
 4390  
 4395  
 4400  
 4405  
 4410  
 4415  
 4420  
 4425  
 4430  
 4435  
 4440  
 4445  
 4450  
 4455  
 4460  
 4465  
 4470  
 4475  
 4480  
 4485  
 4490  
 4495  
 4500  
 4505  
 4510  
 4515  
 4520  
 4525  
 4530  
 4535  
 4540  
 4545  
 4550  
 4555  
 4560  
 4565  
 4570  
 4575  
 4580  
 4585  
 4590  
 4595  
 4600  
 4605  
 4610  
 4615  
 4620  
 4625  
 4630  
 4635  
 4640  
 4645  
 4650  
 4655  
 4660  
 4665  
 4670  
 4675  
 4680  
 4685  
 4690  
 4695  
 4700  
 4705  
 4710  
 4715  
 4720  
 4725  
 4730  
 4735  
 4740  
 4745  
 4750  
 4755  
 4760  
 4765  
 4770  
 4775  
 4780  
 4785  
 4790  
 4795  
 4800  
 4805  
 4810  
 4815  
 4820  
 4825  
 4830  
 4835  
 4840  
 4845  
 4850  
 4855  
 4860  
 4865  
 4870  
 4875  
 4880  
 4885  
 4890  
 4895  
 4900  
 4905  
 4910  
 4915  
 4920  
 4925  
 4930  
 4935  
 4940  
 4945  
 4950  
 4955  
 4960  
 4965  
 4970  
 4975  
 4980  
 4985  
 4990  
 4995  
 5000  
 5005  
 5010  
 5015  
 5020  
 5025  
 5030  
 5035  
 5040  
 5045  
 5050  
 5055  
 5060  
 5065  
 5070  
 5075  
 5080  
 5085  
 5090  
 5095  
 5100  
 5105  
 5110  
 5115  
 5120  
 5125  
 5130  
 5135  
 5140  
 5145  
 5150  
 5155  
 5160  
 5165  
 5170  
 5175  
 5180  
 5185  
 5190  
 5195  
 5200  
 5205  
 5210  
 5215  
 5220  
 5225  
 5230  
 5235  
 5240  
 5245  
 5250  
 5255  
 5260  
 5265  
 5270  
 5275  
 5280  
 5285  
 5290  
 5295  
 5300  
 5305  
 5310  
 5315  
 5320  
 5325  
 5330  
 5335  
 5340  
 5345  
 5350  
 5355  
 5360  
 5365  
 5370  
 5375  
 5380  
 5385  
 5390  
 5395  
 5400  
 5405  
 5410  
 5415  
 5420  
 5425  
 5430  
 5435  
 5440  
 5445  
 5450  
 5455  
 5460  
 5465  
 5470  
 5475  
 5480  
 5485  
 5490  
 5495  
 5500  
 5505  
 5510  
 5515  
 5520  
 5525  
 5530  
 5535  
 5540  
 5545  
 5550  
 5555  
 5560  
 5565  
 5570  
 5575  
 5580  
 5585  
 5590  
 5595  
 5600  
 5605  
 5610  
 5615  
 5620  
 5625  
 5630  
 5635  
 5640  
 5645  
 5650  
 5655  
 5660  
 5665  
 5670  
 5675  
 5680  
 5685  
 5690  
 5695  
 5700  
 5705  
 5710  
 5715  
 5720  
 5725  
 5730  
 5735  
 5740  
 5745  
 5750  
 5755  
 5760  
 5765  
 5770  
 5775  
 5780  
 5785  
 5790  
 5795  
 5800  
 5805  
 5810  
 5815  
 5820  
 5825  
 5830  
 5835  
 5840  
 5845  
 5850  
 5855  
 5860  
 5865  
 5870  
 5875  
 5880  
 5885  
 5890  
 5895  
 5900  
 5905  
 5910  
 5915  
 5920  
 5925  
 5930  
 5935  
 5940  
 5945  
 5950  
 5955  
 5960  
 5965  
 5970  
 5975  
 5980  
 598

14. Expressionsplasmid, kodierend für das multivalente  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1–12.
15. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich  $pDISC3 \times 19-LL$ . 5
16. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich  $pDISC3 \times 19-SL$ .
17. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich  $pPIC-DISC-LL$ .
18. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich  $pPIC-DISC-SL$ . 10
19. Verwendung des multivalenten  $F_v$ -Antikörper-Konstruktes nach einem der Ansprüche 1–12 zur Diagnose und/oder Therapie von Erkrankungen.
20. Verwendung nach Anspruch 19, wobei die Erkrankungen virale, bakterielle oder Tumor-Erkrankungen sind. 15

---

Hierzu 8 Seite(n) Zeichnungen

---

20

25

30

35

40

45

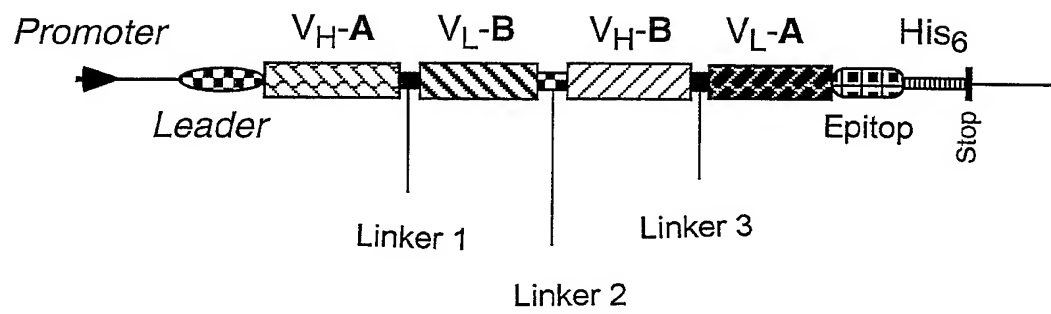
50

55

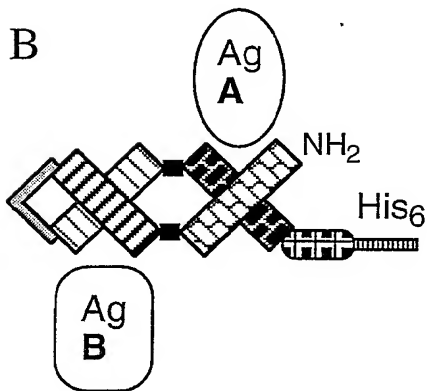
60

65

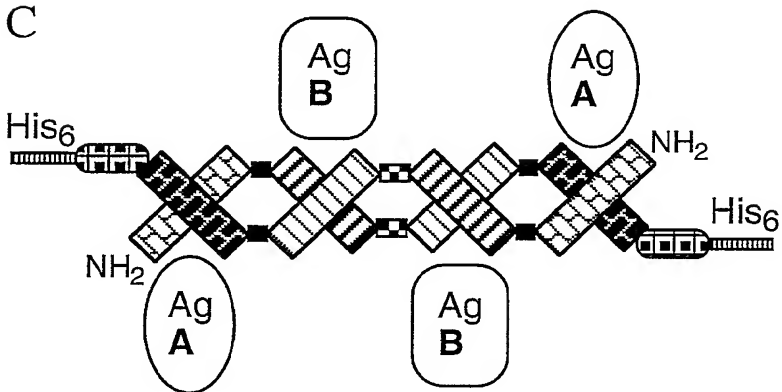
A



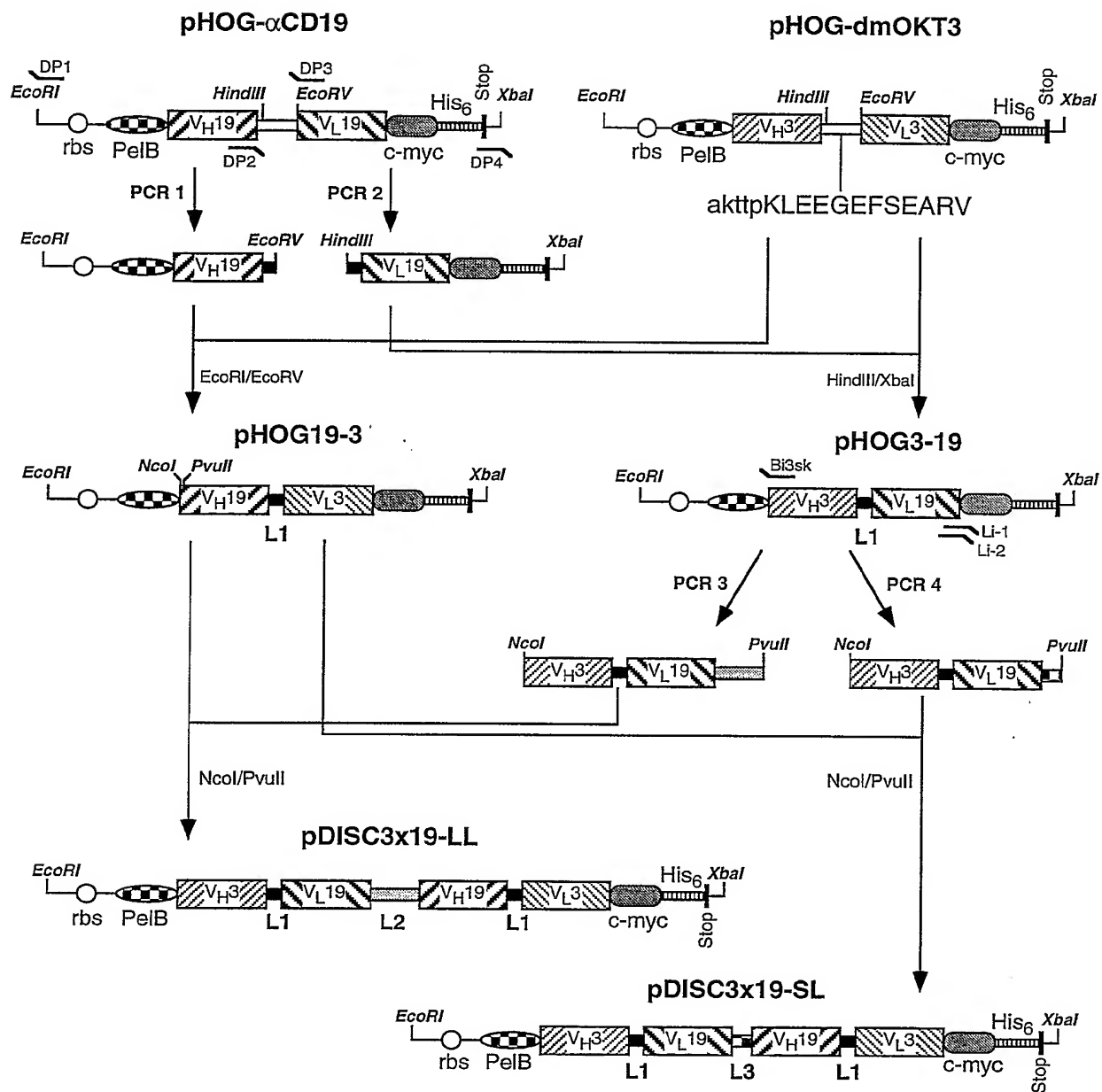
B



C

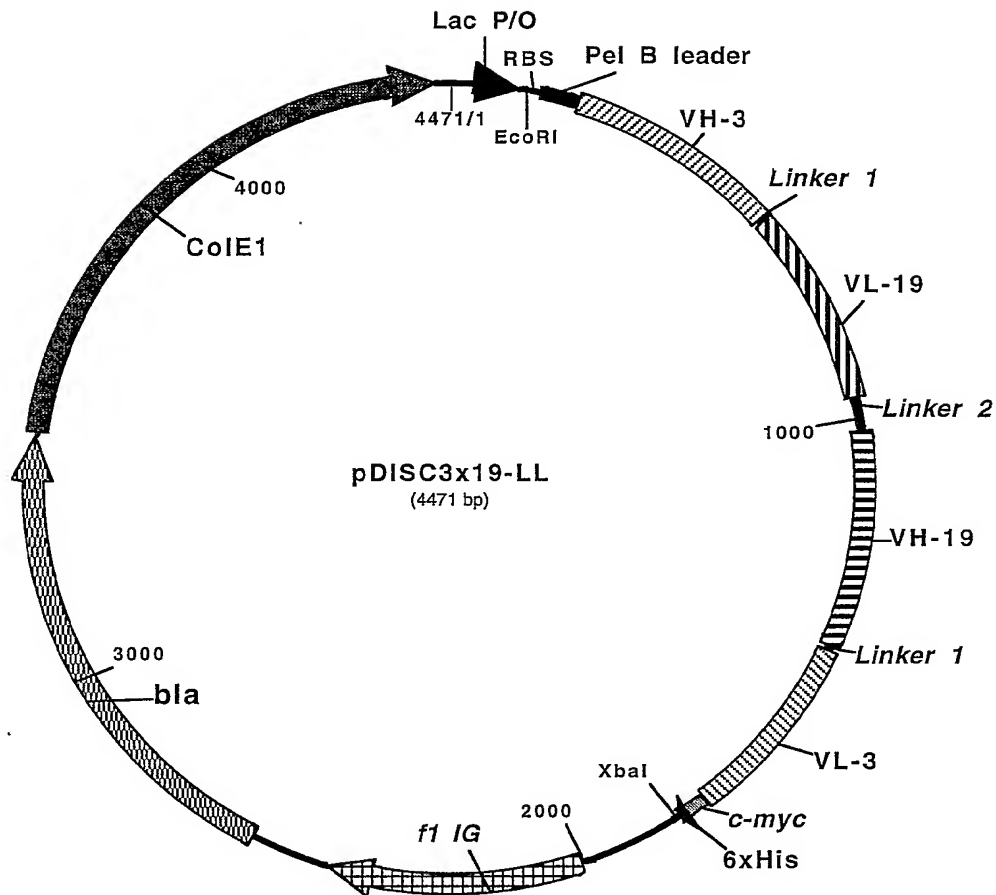


FIGUR 1

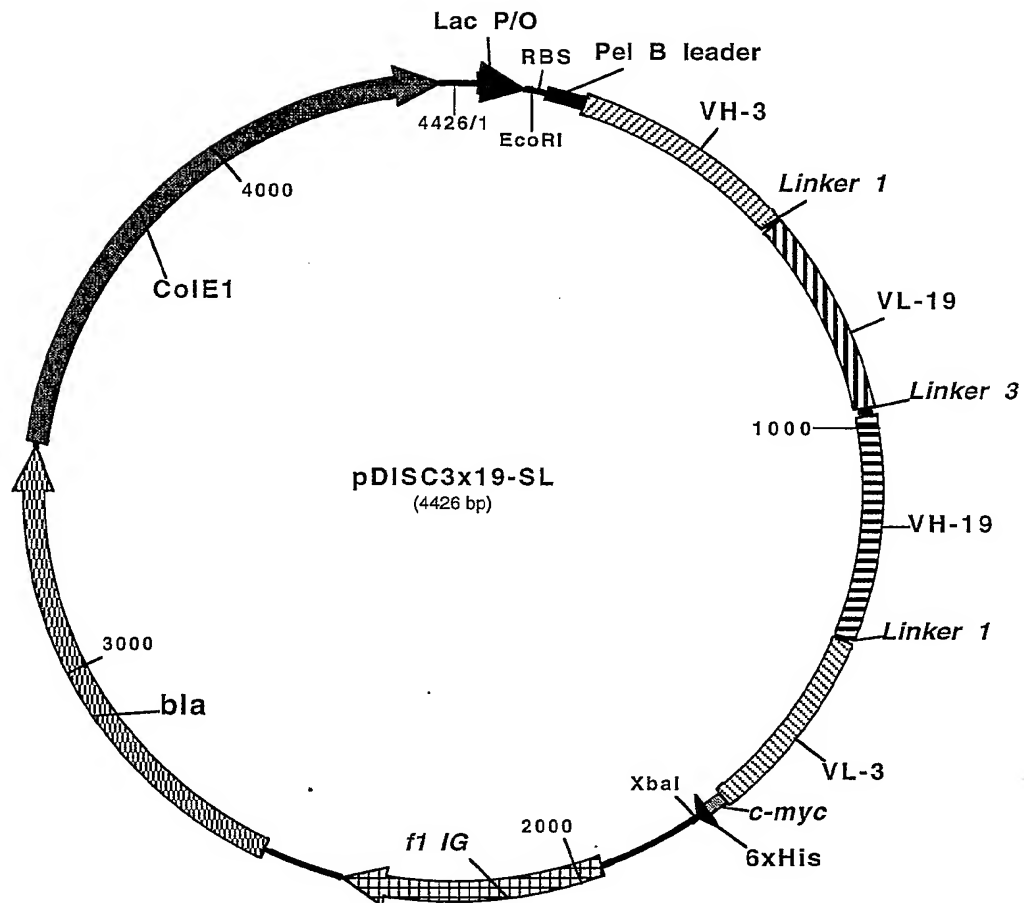


FIGUR 2





FIGUR 3



FIGUR 4

EcoRI RBS PelB leader NcoI  
 1 GAATTCATTAAGAGGAGAAATTAACCATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGCTTGCTGCTGCTGGCAGCTCAGCCGGCCATGG  
 1 M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A M  
 \* Frame-H1 VH anti-CD3  
 92 CGCAGGTGCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTAC  
 22 A Q V Q L Q Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S G Y T F T  
 CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2  
 183 TAGGTACACGATGCACCTGGGTAAACAGAGGCTGGACAGGGCTCTGGAATGGATTGGATACATTAATCCCTAGCCGTGGTTATAC  
 52 R Y T M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P S R G Y T  
 Frame-H3  
 267 TAATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTCAGACTACAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGAC  
 80 N Y N Q K F K D K A T L T T D K S S S T A Y M Q L S S L T  
 CDR-H3 Frame-H4  
 354 ATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATATTATGATGATCATTACAGCCTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCA  
 109 S E D S A V Y Y C A R Y Y D D H Y S L D Y W G Q G T T L  
 CH1 Linker 1 Frame-L1 VL anti-CD19  
 440 CAGTCTCCTCAGCCAAACACACCAAGCTTGGCGGTGATATCTTGCTCACCACAACTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGA  
 138 T V S S A K T T P K L G G D I L L T Q T P A S L A V S L G Q  
 CDR-L1 Frame-L2  
 530 GGGCCACCCTCTCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTGATTATGATGGTGATAGTTATTTGAAGCTGGTACCAACAGATTCCAGGAC  
 168 R A T I S C K A S Q S V D Y D G D S Y L N W Y Q Q I P G  
 CDR-L2 Frame-L3  
 614 AGCCACCCAACTCCTCATCTATGATGCATCCAATCTAGTTTCTGGGATCCACCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT  
 196 Q P P K L L I Y D A S N L V S G I P P R F S G S G S G T D F  
 CDR-L3 Frame-L4  
 702 CACCTCAACATCCATCCTGTGGAGAAGGTGGATGCTGCAACCTATCACTGTGAGCAAAGTACTGAGGATCCGTGGACGTTCCGTGGA  
 225 T L N I H P V E K V D A A T Y H C Q Q S T E D P W T F G G  
 C kappa NotI Linker 2  
 790 GGCACCAAGCTGGAAATCAAAAGGCTGATGCTCGCGCCGCTGGTGGTGGTGGTTCTGGCGGGGTGGTAGCGGTGGTGGCGGC  
 255 G T K L E I K R A D A A A A G G G S G G G G S G G G G  
 PvuII Frame-H1 VH anti-CD19  
 874 TCCGGTGGTGGTGGTAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCTGGGTCTCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGG  
 283 S G G G G S Q V Q L Q Q S G A E L V R P G S S V K I S C K  
 CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2  
 962 CTTCTGGCTATGCATTCACTAGCTACTGGATGAAGCTGGGTGAAGCAGAGGCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTGGCC  
 312 A S G Y A F S S Y W M N W V K Q R P G Q G L E W I G Q I W  
 PstI Frame-H3  
 1049 CTGGAGATGGTGATACTAATACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTAAAGCCACTCTGACTGCAGACGAATCTCCAGCACAGCCTACA  
 341 P G D G D T N Y N G K F K G K A T L T A D E S S S T A Y  
 CDR-H3  
 1133 TGCAACTCAGCAGCCTAGCATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTCTGTGCAAGACGGGAGACTACGACGGTAGGCGGTTATTACTAT  
 369 M Q L S S L A S E D S A V Y F C A R R E T T T V G R Y Y Y  
 Frame-H4 CH1 Linker 1 Frame-L1  
 1219 GCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAACACACCAAGCTTGGCGGTGATATCGTGTCACTC  
 398 A M D Y W G Q G T S V T V S S A K T T P K L G G D I V L T  
 VL anti-CD3 CDR-L1  
 1307 AGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGAATCGG  
 427 Q S P A I M S A S P G E K V T M T C S A S S S V S Y M N W  
 Frame-L2 CDR-L2 Frame-L3  
 1393 TACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAGATGGATTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCACTTCAGGGGCA  
 456 Y Q Q K S G T S P K R W I Y D T S K L A S G V P A H F R G  
 CDR-L3  
 1481 GTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCGGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAA  
 485 S G S G T S Y S L T I S G M E A E D A A T Y Y C Q Q W S S N  
 Frame-L4 C kappa c-myc epitope  
 1569 CCCATTACAGTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAACCGGGCTGATCTGCACCAACTGGATCCGAAACAAAGCTGATCTCAG  
 514 P F T F G S G T K L E I N R A D T A P T G S E Q K L I S  
 His6 tail XbaI  
 1655 AAGAAGACCTAAACTCACATCACCATCACCATCACTAATCTAGA  
 543 E E D L N S H H H H H H .

FIGUR 5

EcoRI RBS PelB leader NcoI

1 GAATTCATTAAGAGGAGAAATTAACCATGAAATACCTATTGCTACGGCAGCCGCTGGCTTGCTGCTGCTGGCAGCTCAGCCGCGCATGG

1 M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A M

Frame-H1 VH anti-CD3

92 CGCAGGTGCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCTCAGTGAAGATGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTAC

22 A Q V Q L Q Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S G Y T F T

CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2

183 TAGGTACACGATGCACCTGGGTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACATTAAATCCTAGCCGTGGTTATAC

52 R Y T M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P S R G Y T

Frame-H3

267 TAATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTACAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGAC

80 N Y N Q K F K D K A T L T T D K S S S T A Y M Q L S S L T

CDR-H3 Frame-H4

354 ATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATATTATGATGATCATTACAGCCTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCA

109 S E D S A V Y Y C A R Y Y D D H Y S L D Y W G Q G T T L

CH1 Linker 1 Frame-L1 VL anti-CD19

440 CAGTCTCTCTCAGCCAAAACACACCAAGCTTGGCGGTGATATCTTGCTCACCCAACTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGCAGA

138 T V S S A K T T P K L G G D I L L T Q T P A S L A V S L G Q

CDR-L1 Frame-L2

530 GGGCCACCATCTCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTGGATTATGATGGTGTAGTTATTTGAACTGGTACCAACAGATTCCAGGAC

168 R A T I S C K A S Q S V D Y D G D S Y L N W Y Q Q I P G

CDR-L2 Frame-L3

614 AGCCACCCAACTCCTCATCTATGATGCATCCAATCTAGTTTCTGGGATCCCAAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT

196 Q P P K L L I Y D A S N L V S G I P P R F S G S G S G T D F

CDR-L3 Frame-L4

702 CACCCCTCAACATCCATCCTGTGGAGAAGGTGGATGCTGCAACCTATCACTGTGAGCAAAGTACTGAGGATCCGTGGACGTTCCGTGGA

225 T L N I H P V E K V D A A T Y H C Q Q S T E D P W T F G G

C kappa NotI Linker 3 PvuII Frame-H1

790 GGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCGGCCGCTGGTGGCCAGGGTCTGCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGCTGAGCT

255 G T K L E I K R A D A A A A G G P G S Q V Q L Q Q S G A E L

VH anti-CD19 CDR-H1 Frame-H2

879 GGTGAGGCCTGGGTCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGCTTCTGGCTATGCATTCAGTAGCTACTGGATGAAGTGGTGAAGCAGAGGC

284 V R P G S S V K I S C K A S G Y A F S S Y W M N W V K Q R

CDR-H2

968 CTGGACAGGCTCTTGAGTGGATTGGACAGATTGGCCCTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTAAAGCC

314 P G Q G L E W I G Q I W P G D G D T N Y N G K F K G K A

Frame-H3

1051 ACTCTGACTGCAGACGAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTAGCATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAC

342 T L T A D E S S S T A Y M Q L S S L A S E D S A V Y F C A R

CDR-H3 Frame-H4 CH1

1142 GGGAGACTACGACGGTAGGCCGTTATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAA

372 R E T T T V G R Y Y Y A M D Y W G Q G T S V T V S S A K

Linker 1 Frame-L1 VL anti-CD3

1226 CAACACCCAGCTTGGCGGTGATATCGTCTCACTCAGTCTCCAGCAATCATGCTGCATCTCCAGGGGAGAAGTCAACATGACCTGCA

400 T T P K L G G D I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C

CDR-L1 Frame-L2 CDR-L2

1316 GTGCCAGCTCAAGTGTAAAGTTACATGAACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCAAAAGATGGATTATGACACATCCAA

430 S A S S S V S Y M N W Y Q Q K S G T S P K R W I Y D T S K

Frame-L3

1401 ACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCACTTCAGGGGAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCGGCATGGAGGCTGAAGATGC

458 L A S G V P A H F R G S G S G T S Y S L T I S G M E A E D A

CDR-L3 Frame-L4 C kappa

1491 TGCCACTTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCATTTCACGTTGCGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAACCGGGCTGATACGCTG

488 A T Y Y C Q Q W S S N P F T F G S G T K L E I N R A D T A

c-myc epitope His6 tail XbaI

1578 ACCAACTGGATCCGAACAAAAGCTGATCTCAGAAAGAAGACCTAAACTCACATCACCATCACCATCACTAATCTAGA

517 P T G S E Q K L I S E E D L N S H H H H H H H .

FIGUR 6

941 **ATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTAC**  
1► M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T T

**alpha-factor signal**

1015 AACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATG  
25► T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L E G D F D

1089 TTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTATTGTTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCT  
50► V A V L P F S N S T N N G L L F I N T T I A S I A

**XhoI**

**EcoRI**

1163 GCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAATTC**CAGGTGCAACTGCAGCAGTC**  
75► A K E E G V S L E K R E A E A E F Q V Q L Q Q S

**VH anti-CD3**

1234 **TGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCT**  
98► G A E L A R P G A S V K M S C K A S

FIGUR 7

941 **ATGAGATTTCTTCAATTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTAC**  
1► M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T T

**alpha-factor signal**

1015 **AACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCGGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATG**  
25► T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L E G D F D

**BsrDI**

1089 **TTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCT**  
50► V A V L P F S N S T N N G L L F I N T T I A S I A

**XhoI****EcoRI**

1163 **GCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAATTCATGGCGCAGGTGCAACTGCAG**  
75► A K E E G V S L E K R E A E A E F M A Q V Q L Q

**VH anti-CD3**

1235 **CAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCT**  
99► Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S

FIGUR 8